动 物 学 研 究 1998，19（3）：177—183 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

马鹿四个亚种的起源和遗传分化研究

李 明[1] 王小明 盛和林
（华东师范大学生物系 上海 200062）

玉手英利 增田隆一 永田纯子 大泰司纪之
（石卷专修大学 石卷 986 日本） （北海道大学 札幌 060 日本）

摘要 利用线粒体 DNA 的细胞色素 b 基因片段序列差异来分析探讨马鹿（*Cervus elaphus*）4 个亚种的起源和遗传分化问题。结果表明：马鹿各亚种的 DNA 差异都达到了亚种分化水平，并指出天山马鹿（*C. e. songaricus*）东西两个种群可能是两个不同的亚种；马鹿各亚种在 54—76 万年前开始分化，其中天山马鹿最先分化出来；马鹿与梅花鹿（*Cervus nippon*）间较低的种间遗传差异可能说明二者分化较晚，亲缘关系较近。

关键词 马鹿，起源，遗传分化，细胞色素 b，DNA 序列
中图分类号 Q959.842

马鹿（*Cervus elaphus*）属偶蹄目（Artiodactyla）鹿科（Ceridae）鹿亚科（Cervinae），是鹿类动物中最具优势的种，种内变异最丰富，分布也最广——从北非西北部、欧洲、亚洲到北美都有广泛的分布，在全世界共有 21 或 22 个亚种（Dolan，1988；大泰司纪之，1995）。马鹿是梅花鹿在中东向欧洲和北非扩展的过程中产生的一个新种，这种原始型马鹿到更新世中期返回中国大陆（大泰司纪之，1992）。马鹿在分布扩展过程中，体型逐渐大型化，并形成 3 个亚种群，其中有两个亚种群 8 个亚种在中国有分布，它们是东北亚种（*C. e. xanthopygus*）、阿拉善亚种（*C. e. alasnanicus*）、甘肃亚种（*C. e. kansuensis*）、西藏亚种（*C. e. wallichi*）、阿尔泰亚种（*C. e. sibiricus*）、天山亚种（*C. e. songaricus*）、塔里木亚种（*C. e. yarkandensis*）和四川亚种（*C. e. macneilli*）（Ohtaishi 等，1990；盛和林，1992）。

马鹿的系统进化及亚种分化研究是了解鹿属动物进化过程的一个重要方面。前人关于马鹿亚种分化的研究都是根据形态特征来进行的，但 Geist（1992）指出偶蹄类的形态特征在分类及进化研究中并不总是有意义的，因为动物的形态特征受环境条件的影响而有很大的变化。因此，一般认为在现代动物分类中，种和亚种划分都应以系统进化关系为基础来进行（Cronin，1993）。

线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）是母系遗传，分子量小，进化速度快，是核 DNA 的 5—10 倍（Brown，1981，1983）。这些特性使之成为一种有效的遗传进化研

---

①现在中国科学院动物研究所

本文 1997-04-09 收到，1998-02-16 修回

究的标记物质(张亚平等，1992)。线粒体DNA上的细胞色素 b(cytochrome b)基因的进化速度适中，一个较小的基因片段就包含着从种内到种间乃至科间的遗传进化信息(Meyer 等，1990)。因此本研究利用 mtDNA 的细胞色素 b 基因片段的 DNA 序列，在分子水平上从系统进化的角度来进一步分析探讨马鹿 4 亚种的起源和遗传分化。

1 研究动物和实验方法

1.1 研究动物

研究动物为梅花鹿(*C. nippon pseudaxis*，CNP)，马鹿的东北亚种(CEX)、阿拉善亚种(CEA)、甘肃亚种(CEK)及天山亚种的哈密种群(Hami，CEH)和伊犁种群(Yili，CEL)，以水鹿(*Cervus unicolor*，CEU)为外群(outgroup)。样品均为凝集血块。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 将 0.5 g 样品放入玻璃匀浆器中，加 1 mL SET(0.1 mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-HCl，pH7.5; 1 mmol/L EDTA，pH8.0)进行匀浆，按 Masuda 等(1995)的方法进行 DNA 提取。

1.2.2 PCR 扩增 利用通用引物扩增线粒体 DNA 上细胞色素 b 的基因片段，引物为 L14742 (5′-GATATGAAAAACCATCGTTG-3′)和 H15149(5′-TCAGAATGATATTTGTCCTCA-3′)(Kocher 等，1989; Irwin 等，1991)。反应总体积为 50 μL，含有 50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)，1.5 mmol/L $MgCl_2$，0.001% 明胶，4 种 dNTP 各为 200 μmol/L，1.25UTaq 酶(5 U/μL，Perkin)，引物各为 12.5 pmol，模板为 1 μL，加入一滴矿物油，在扩增仪(Perkin-Elmer/Cetus，USA)上进行 35 个循环，每个循环为 94℃ 1 min，50℃ 1 min，72℃ 1 min，最后一循环结束后在 72℃下保温 10 min。再以该扩增产物为模板，反应体积为 100 μL，按 Gyllersten 等(1988)的方法进行不对称扩增，两种引物浓度比为 100：1，进行 30 个循环反应，其他反应条件同上。

1.2.3 DNA 序列测定 取 7 μL 经 Centrion-30(Amicon)浓缩过的上述扩增产物，利用测序试剂盒(Sequenase TM Version 2.0，USA)，按 Sanger 等(1977)方法进行 DNA 序列测定，并用 Gene Works (Intelligenetic) 进行 DNA 序列排列。

1.2.4 DNA 序列分析 按照 Kimura(1980)双参数法(two-parameter method)，对每个核苷酸位点的替换数进行估计，并计算物种间的 DNA 序列差异。利用 MEGA(Kumar 等，1993)构树软件中的 UPGMA 法来构建系统进化树，置信度用 Bootstrap 值来估计(Felsenstein，1985)。以水鹿作为外群比较。

2 结果

2.1 细胞色素 b 的序列及其差异

从马鹿各亚种和梅花鹿的样品中抽提总 DNA，然后用 PCR 技术扩增并测定出线粒体 DNA 上细胞色素 b 的 367 bp 基因片段序列(图 1)。

马鹿各亚种和梅花鹿的细胞色素 b 的序列差异值和转换/颠换值见表 1。从表 1 中可知，马鹿各亚种间的细胞色素 b 的序列差异在 1.36%—1.91%(5/367—7/367)之间；梅花鹿与马鹿 4 个亚种之间的序列差异则较小，在 3.00%—4.09%(11/367—15/367)之间，平均为 3.60%。

CNP	TCCGAAAAAC	CCACCCGTTA	ATAAAAATTG	TAAACAACGC	ATTTATTGAC	50
CEH	CCCGGAAAAC	CCACCCATTA	ATAAAAATTG	TAAACAACGC	ATTTATTGAC	
CEL	TCCGAAAAAC	CCACCCATTA	ATAAAAATTG	TAAACAACGC	ATTTATTGAC	
CEA	TCCGAAAAAC	CCACCCATTA	ATAAAAATTG	TAAACAACGC	ATTTATTGAC	
CEX	CCCGAAAAAC	CCACCCATTA	ATAAAAATTG	TAAACAACGC	ATTTATTGAC	
CEK	TCCGAAAAAC	CCACCCATTA	ATAAAAATTG	TAAACAACGC	ATTTATTGAC	
CEU	TCCGAAAAAC	CCACCCATTA	ATGAAAATTG	TAAACAACGC	ATTCATTGAC	

CNP	CTCCCCGCCC	CATCAAATAT	TTCATCCTGA	TGAAATTTCG	GCTCCTTACT	100
CEH	CTCCCAGCCC	CATCAAATAT	TTCATCCTGA	TGAAATTTCG	GCTCCTTACT	
CEL	CTCCCAGCCC	CATCGAATAT	TTCATCCTGA	TGAAATTTCG	GCTCCTTACT	
CEA	CTCCCAGCCC	CATCGAATAT	TTCATCCTGA	TGAAATTTCG	GCTCCTTACT	
CEX	CTCCCAGCCC	CATCGAATAT	TTCATCCTGA	TGAAATTTCG	GCTCCTTACT	
CEK	CTCCCAGCCC	CATCGAATAT	TTCATCCTGA	TGAAATTTCG	GCTCCTTACT	
CEU	CTCCCAGCCC	CATCAAATAT	TTCATCCTGA	TGAAATTTCG	GCTCCTTACT	

CNP	AGGAATTTGT	CTAATCCTAC	AAATTCTCAC	AGGCCTATTC	CTAGCAATAC	150
CEH	AGGAATTTGT	CTAATCCTAC	AAATTCTCAC	AGGCCTATTC	CTAGCAATAC	
CEL	AGGAATTTGT	CTAATCCTAC	AAATTCTCAC	AGGCCTATTC	CTAGCAATAC	
CEA	AGGAATTTGT	CTAATTCTAC	AAATTCTCAC	AGGCCTATTC	CTAGCAATAC	
CEX	AGGAATTTGT	CTAATTCTAC	AAATTCTCAC	AGGCCTATTC	CTAGCAATAC	
CEK	AGGAATTGCT	CTAATTCTAC	AAATTCTCAC	AGGCCTATTC	CTAGCAATAC	
CEU	AGGAATTTGT	CTAATCCTAC	AAATCATTAC	AGGCCTATTC	CTAGCAATAC	

CNP	ACTATACATC	TGACACAATA	ACAGCATTTT	CCTCTGTCAC	CCATATCTGC	200
CEH	ACTATACATC	CGATACAATA	ACAGCATTTT	CCTCTGTCAC	CCATATCTGT	
CEL	ACTATACATC	CGATACAATA	ACAGCATTTT	CCTCTGTCAC	CCATATCTGT	
CEA	ACTATACATC	CGATACAATA	ACAGCATTTT	CCTCTGTCAC	CCATATCTGT	
CEX	ACTATACATC	CGATACAATA	ACAGCATTTT	CCTCTGTCAC	CCATATCTGT	
CEK	ACTATACATC	AGATACAATA	ACAGCATTTT	CCTCTGTCAC	CCATATCTGT	
CEU	ACTATACATC	CGACACAATA	ACAGCATTCT	CCTCTGTTAC	CCATATCTGC	

CNP	CGAGATGTCA	ATTATGGTTG	AATTATTCGA	TACATACACG	CAAACGGGGC	250
CEH	CGAGATGTCA	ATTATGGTTG	AATTATTCGA	TACATACACG	CAAACGGGGC	
CEL	CGAGATGTCA	ATTATGGTTG	AATTATTCGA	TACATACACG	CAAACGGGGC	
CEA	CGAGATGTCA	ATTATGGTTG	AATTATTCGA	TACATACACG	CAAACGGGGC	
CEX	CGAGATGTCA	ACTATGGTTG	AATTATTCGA	TACATACACG	CAAACGGGGC	
CEK	CGAGATGTTA	ATTATGGTTG	AATTATTCGA	TACATACACG	CAAACGGGGC	
CEU	CGAGATGTCA	ATTACGGCTG	AATCATTCGA	TATATACACG	CAAAAGGGGC	

CNP	ATCAATATTC	TTCTTCTGCC	TATTCATACA	TGTAGGACGA	GGCCTGTACT	300
CEH	ATCAATATTT	TTCTTCTGCC	TATTTATACA	TGTAGGACGA	GGCCTATACT	
CEL	ATCAATATTT	TTCTTCTGCC	TATTCATACA	TGTAGGACGA	GGCCTATACT	
CEA	ATCAATATTT	TTTTTCTGCC	TATTTATACA	TGTAGGACGA	GGCCTATACT	
CEX	ATCAATATTT	TTCTTCTGCC	TATTTATACA	TGTAGGACGA	GGCCTATACT	
CEK	ATCAATATTT	TTCTTCTGCC	TATTTATACA	TGTAGGACGA	GGCCTATACT	
CEU	ATCAATATTT	TTCTTCTGTC	TATTTATACA	CGTAGGACGA	GGCCTGTACT	

CNP	ACGGATCATA	TACTTTTCTA	GAGACATGAA	ACATCGGAGT	AATTCTCCTA	350
CEH	ACGGGTCATA	CACTTTTCTA	GAGACATGAA	ACATCGGAGT	AATTCTCCTA	
CEL	ACGGGTCATA	CACTTTTCTA	GAGACATGAA	ACATCGGAGT	AATTCTCCTA	
CEA	ACGGGTCATA	TACTTTTCTA	GAGACATGAA	ACATTGGAGT	AATTCTCCTA	
CEX	ACGGGTCATA	TACTTTTATA	GAGACATGAA	ACATCGGAGT	AATTCTCCTA	
CEK	ACGGGTCATA	TACTTTTATA	GAGACATGAA	ACATCGGAGT	AATTCTCCTA	
CEU	ACGGATCATA	CACCTTTCTA	GAGACATGAA	ACATTGGAGT	AATCCTCCTA	

CNP	TTTACAGTTA	TAACCAC
CEH	TTTACAGTTA	TAACCAC
CEL	TTTACAGTTA	TAACCAC
CEA	TTTACAGTTA	TAACCAC
CEX	TTTACAGTTA	TAACCAC
CEK	TTTACAGTTA	TAACCAC
CEU	TTTACAGTTA	TAACCAC

图 1 马鹿和梅花鹿的细胞色素 b 的基因片段序列(367 bp)
Fig. 1 Alignment of cytochrome b nucleotide sequences (367 bp) of red deer and sika deer

表 1 细胞色素 b 的序列差异百分比 (对角线以上)和转换/颠换数 (对角线以下)
Table 1 Percentage divergence (above diagonal) and numbers of transitions/transversions (below diagonal) for cytochrome b sequences

	CNP	CEH	CEL	CEA	CEX	CEK	CEU
CNP		3.54	3.00	3.81	4.09	3.54	6.00
CEH	12/1		1.09	1.91	1.63	1.91	6.27
CEL	10/1	4/0		1.36	1.63	1.36	6.27
CEA	13/1	7/0	5/0		1.36	1.63	6.00
CEX	13/2	5/1	5/1	4/1		1.36	7.09
CEK	10/3	3/2	4/3	4/2	4/1		7.63
CEU	20/2	21/2	21/2	20/2	23/3	23/5	

2.2 系统进化树

根据 DNA 序列来构建了分子系统进化树(图 2)。

3 讨论

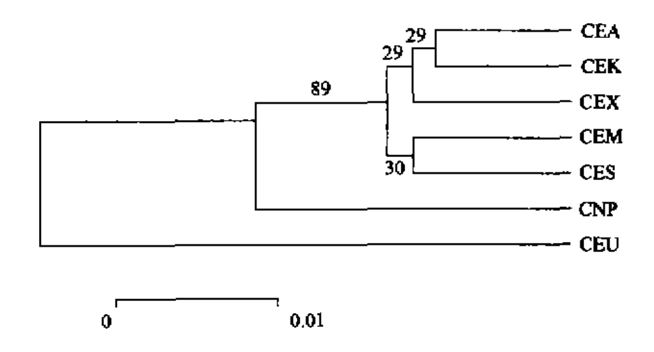


图 2 由 UPGMA 法构建的细胞色素 b 序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the cytochrome b sequence constructed by the UPGMA method

每个位点上的核苷酸替换数用 Kimura 双参数法估计，置信值来自 500 个复制序列统计，0.01 表示序列差异(the numbers of nucleotide substitutions per site, indicated by the sale, were estimated with Kimura's two-parameter method. Bootstrap vaues about branches were derived from 500 replication. The bar scale of 0.01 indicated sequence diversity)。

在有关亚种划分上，一般认为同一亚种应享有一特定的地理区域或栖息地，具有系统进化上一致的表现型特征，相对于同种的其他亚种具有独特的进化历史，且在生殖上是相容的(O'Brien 等，1991)。本文所研究的 4 个马鹿亚种——东北亚种、甘肃亚种、阿拉善亚种和天山亚种的地理分布基本上相互隔离，且从形态学上比较也认为是不同的亚种(Dolan，1988；Groves 等，1987)。Geist (1991)的研究指出，鹿的形态特征不一定能正确反映出其系统进化的关系。因此，本研究从分子水平上，并结合形态研究结果来分析马鹿 4 个亚种间的系统进化关系。

在鹿科动物中，种间的线粒体 DNA 序列差异应在 4%—12%之间，亚种间的 DNA 序列一般在 1%—3%之间(Cronin，1991；Tamate 等，1995)。从表 1 中可知，4 个亚种间的细胞色素 b 的序列差异在 1.36%—1.91%之间，即中国马鹿的各亚种间 DNA 差异是处于亚种水平上的分化，这一结果与形态学上研究结果相印证。但在天山亚种的两个种群之间的 DNA 差异为 1.09%，而且这两个种群分别分布于天山的东西两端，相距较远。如果依据 O'Brien 等(1991)、Cronin(1991)和 Tamate 等(1995)的观点，这两个种群可能为两个不同的亚种。因此，还必须对这两个种群从种群生态学、形态学、核 DNA 特征等方面进一步研究。

系统进化研究得出梅花鹿与马鹿是两个近缘种，马鹿是从梅花鹿群中分化出来的，且马鹿是在更新世以后出现的(大泰司纪之，1992)。从表 1 中可知，中国梅花鹿与马鹿间的序列差异较小，平均只有 3.60%，即它们之间存在着较小的种间差异。图 2 的进化树也反映出，所有马鹿亚种聚合在一起，并与梅花鹿形成姐妹群关系。

根据哺乳动物的细胞色素 b 的序列进化速度至少为 2.5%／百万年(Meyer 等，1990；Irwin 等，1991)，从表 1 中可得出，马鹿和梅花鹿的分化时间是在 150 万年前，这与 Cook(1993) 关于马鹿和梅花鹿的分化时间在 70—190 万年前的结论相符。马鹿各亚种间的分化时间在 54—76 万年前，这与马鹿从中东和欧洲返回中国大陆的时间基本一致(大泰司纪之，1992)。马鹿在返回过程中逐渐发生了分化，最先是天山马鹿分化，大约在 54—76 万年前；东北马鹿与阿拉善亚种和甘肃亚种的分化时间在 54 万年前左右，这也符合在中国马鹿是从西向东逐渐分化扩散的；天山亚种两种群的分化时间在 43 万年前左右，可能是它们与其他 3 个亚种分化之后，适应了其独特的生态环境而进一步分化的。图 2 也基本反映了马鹿各亚种的分化过程。

参 考 文 献

大泰司纪之，1992. 中国鹿类的起源和进化. 见：盛和林等，中国鹿类动物. 上海：华东师范大学出版社. 8—16.

张亚平，施立明，1992. 动物线粒体DNA多态性的研究概述. 动物学研究，13：289—298.

盛和林，1992. 中国鹿类动物. 上海：华东师范大学出版社. 305.

大泰司纪之，1995. アカシカ——最も繁栄しているシカ类. 畜产の研究，49(1)：132—139.

Brown W M，1981. Mechanism of evolution in animal mitochondrial DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*，**61**：119–134.

Brow W M，1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In：Nei，Kocher R K (eds). Evolution of genes and proteins. Sunderland：Sinauer Associates Ins. 62–85.

Cronin A M，Vyse E R，Cameron D G，1988. Genetic relationships between mule deer and white-tailed deer in Montana. *J. Wildl. Manage*，**52**(2)：320–328.

Cook C E Jr. 1993. The historical biogeography and phylogeny of sika deer (*Cervus nippon*) in east Asia. Ph. D. dissertation. University of California，Berkeley. 141.

Cronin A M，1991. Mitochondrial DNA phylogeny of deer (Cervidae). *J. Mamm.*，**72**(3)：553–566.

Cronin A M，1993. Mitochondrial DNA in wildlife taxonomy and conservation biology：Cautionary notes. *Wildl. Soc. Bull.*，**21**：339–343.

Dolan M J，1988. A deer of many lands. Published by the Zoological Society of San Diego.

Felsenstein J，1985. Confidence limits on phylogenies：an approach using the bootstrap. *Evolution*，**39**：783–791.

Geist V，1991. Taxonomy：on an objective definition of subspecies，taxa as legal entities，and its application to *Ramgifer tarandus*. Lin，1785. In：Butler C E，Mahoney S P，eds. Proc. Fourth North American Caribou Workship. St. John's Newf. 1–36.

Geist V，1992. Endangered species and the law. *Nature*，**357**：274–276.

Groves C P，Grubb P，1987. Relationships of living deer. In：Wemmer C M，ed. Biology and management of the Cervidae Washington Smithsonican Inst. Press. 21–59.

Gyllenster U B，Erlich H A，1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain recation and its application to direct sequencing of the HLA-Aocus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，**85**：81–89.

Irwin D M，Kocher T D，Wilson A C，1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.*，**32**：128–144.

Kimura M，1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*，**16**：111–120.

Kocher T D，Thomas W K，Meyer A *et al*，1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals：Amplication and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*，USA，**86**：6190–6200.

Kumar S，Tamura K，Nei M，1993. MEGA：Molecular evolutionary genetics analysis，Version 1.01. Pennsylvenia State University Press.

Masuda R M，Yoshida C，1995. Two Japanese wildcats，the Tsushima cat and the Iriomose cat，show the same mitochondrial DNA lineageas the Leopard cat Felis bengalensis. *Zoological Science*，**12**：655–659.

Meyer A，Kocher T D，Basasibwaki P *et al*，1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichild fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*，**347**：550–553.

Ohtaishi N，Gao Y T，1990. The distribution of all species of deer (Tragulidae，moschidae，Cervidae) in China. *Mammal Review*，**201**：125–144.

O'Brien，Stephen J，Mayr E *et al*，1991. Bureaecratic mischife：Recognizing endangered species and subspecies. *Science*，**251**：1187–1188.

Sanger F，Nicklen S，Coulson A R，1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*，USA，**74**：5463–5467.

Tamate H B，Tsuchiya T，1995. Mitochondrial DNA polymorphism in subspecies of the Japanese sika deer，*Cervus nippon*. *J. Heredity*，**86**(3)：211–215.

ORIGIN AND GENETIC DIVERSITY OF FOUR SUBSPECIES OF RED DEER (*Cervus elaphus*)

LI Ming WANG Xiao-ming SHENG He-lin
(*Department of Biology, East China Normal University, Shanghai* 200062)
H. Tamate
(*Senshu University of Ishinomaki, Ishinomaki* 986)
R. Masuda J. Nagata N. Ohtaishi
(*Hokkaido University, Sapporo* 060)

Abstract

367 bps of cytochrome b were sequenced with PCR. Subspecific origin and genetic diversity of red deer in china were studied according to differences of cytochrome b DNA sequences. The DNA differences of 4 subspecies were within subspecific diversity, but two populations of Tianshan red deer may be regarded as two subspecies. The divergence occured about 0.54–0.76 Mya ago among 4 subspecies and Tianshan red deer diverged first from the other subspecies. It may be thought that red deer and sika deer diverged later and had closer relationships because of lower interspecific genetic difference between them.

Key words Red deer, Origin, Genetic diversity, Cytochrome b, DNA Sequence